



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS BAIXADA SANTISTA**  
**Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar**

**VITÓRIA AMI MATSUDA**

**CORRELAÇÃO QUALITATIVA DO POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTIMALÁRICO DE  
EXTRATOS DE BACTÉRIAS MARINHAS BRASILEIRAS: ACESSO AO BANCO DE  
CEPAS DO LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MARINHA**

**Santos**

**2021**

**VITÓRIA AMI MATSUDA**

**CORRELAÇÃO QUALITATIVA DO POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTIMALÁRICO DE  
EXTRATOS DE BACTÉRIAS MARINHAS BRASILEIRAS: ACESSO AO BANCO DE  
CEPAS DO LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MARINHA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência parcial para obtenção do grau de  
bacharel em Ciência e Tecnologia do Mar, ao  
Instituto do Mar da Universidade Federal de São  
Paulo – Campus Baixada Santista.

Orientadora:

Profa. Dra. Paula Christine Jimenez



Discente:

Vitória Ami Matsuda



SANTOS – SP

2021

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M434c Matsuda, Vitória Ami.  
Correlação qualitativa do potencial anticâncer e  
antimalárico de extratos de bactérias marinhas  
brasileiras: acesso ao banco de cepas do Laboratório  
de Farmacologia Marinha. / Vitória Ami Matsuda;  
Orientadora Paula Christine Jimenez; Coorientador .  
-- Santos, 2021.  
38 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Bacharelado Interdisciplinar em  
Ciências e Tecnologia do Mar) -- Instituto do Mar,  
Universidade Federal de São Paulo, 2021.

1. Produtos naturais marinhos. 2.  
Actinobactérias. 3. Atividade anticâncer. 4.  
Atividade antimalárica. 5. Potencial biotecnológico.  
I. Jimenez, Paula Christine, Orient. II. Título.

CDD 551.46

*"Everything can't always be perfect, it's okay*

*You're doing great right now"*

*Dreamcatcher - Tension*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que trabalharam para me darem uma boa educação, que deram apoio, amor e compreensão durante a realização deste trabalho. Quero que saibam que sou feliz por vocês estarem comigo, amo vocês.

À minha avó Satiko Matsuda (*in memoriam*) e à minha tia avó Neusa Setuko Harada por me amarem, cuidarem e por acreditarem em mim.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula C. Jimenez, ou como eu a chamo, Paulinha, por toda a amizade que começou antes deste trabalho, por ser uma pessoa e orientadora incrível, por toda paciência, ajuda e ensinamentos no decorrer deste trabalho, por todas as palavras de incentivo e pelas palavras de conforto, compreensão e apoio durante momentos difíceis. Sempre irei te admirar.

Às minhas amigas Laís Cardoso, Amanda Aguiar e Bianca Bentley, por todos os momentos de descontração, pelas conversas até a madrugada no banco do prédio ou por vídeo-chamada, por todas as risadas, choros e surtos que passamos juntas. Saudades de comer os lanches do Fish n' Grill com vocês e falar sobre o que aconteceu nas festas. E, um dia ainda vamos ao rodízio de esfiha. Sempre vou lembrar-me das vezes que disse para vocês “vai dar tudo certo” e de escutar da Amanda nos momentos difíceis “não parece, mas a vida é bela”. Espero continuar nossa amizade e cumplicidade para além da faculdade.

À minha amiga e mãe de coração, Dayane Melo, uma das pessoas mais incríveis que conheci na faculdade. Faltam-me palavras para agradecer todos os momentos que passamos juntas, sejam eles de alegria, tristeza, surto e quaisquer outras situações. Obrigada por estar do meu lado, principalmente quando mais precisei. Ficarei de perto acompanhando sua evolução e saiba que sempre irei apoiar e torcer por você porque sei que é capaz de realizar seus sonhos. Também espero continuar nossa amizade e cumplicidade para além da faculdade.

Aos amigos que eu fiz no BICT, que passaram comigo pelos perrengues de fazer bate e volta de São Paulo-Santos no nosso primeiro ano de faculdade; que estiveram presentes neste processo de formação; por todos os momentos alegres e difíceis que passamos juntos.

Ao Dhiego e à Bruna por me ensinarem e auxiliarem no laboratório.

À todos do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP, e ao Prof. Dr. Mauro Ferreira de Azevedo pelo acesso ao banco de cepas e pelo compartilhamento dos dados de atividade antimalárica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrezza Justino Gozzo Andreotti pela disponibilidade e por aceitar ser a avaliadora do trabalho.

Agradeço a tudo e a todos que fizeram parte do meu crescimento e amadurecimento, acadêmico e pessoal

## RESUMO

Os micro-organismos marinhos vêm se destacando como uma importante fonte de substâncias com potencial farmacológico. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa atua há mais de uma década bioprospectando micro-organismos marinhos brasileiros e conta com um banco de cepas com mais de 1.500 bactérias. Dentre elas, já são reconhecidas aquelas que produzem substâncias que demonstram potencial anticâncer. E agora, há o interesse em acessar o banco de cepas para a atividade antimalárica. Logo, o objetivo deste trabalho é comparar, a partir de parâmetros qualitativos, os potenciais anticâncer e antimalárico dos extratos obtidos de bactérias recuperadas de sedimento marinho depositadas no banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP. Informações sobre as 131 cepas analisadas no presente estudo foram acessadas através do banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, que inclui meio, método e local de coleta, além da atividade inibitória no crescimento de células de linhagem tumoral HCT-116 em cultura. Os dados de atividade antimalárica dos extratos foram gerados e cedidos pelo grupo de pesquisa colaborador. Foram confeccionados dois gráficos de dispersão do % de inibição do crescimento do parasita (atividade antimalárica) X % de inibição do crescimento da célula tumoral (atividade anticâncer) para auxiliar na visualização dos extratos com perfil de atividade biológica mais interessantes. As cepas foram também organizadas por meio, método e local de coleta. Cepas recuperadas de sedimento coletado na região de Ubatuba foram as mais numerosas neste estudo. Cepas recuperadas pelo método M2 e o meio SWA foram predominantes, sendo sua combinação responsável por 39,7% do total das cepas analisadas. A partir dos dados de atividade anticâncer e dos dados antimaláricos de cada extrato, foi possível construir dois gráficos de dispersão; o primeiro, 5x5 (comparando os extratos testados na mesma concentração de 5 µg/mL em ambos os ensaios) teve 55 cepas ativas, sendo que destas 30,5% foram ativas exclusivamente em algum dos dois ensaios biológicos. O segundo gráfico, 5x50 (comparando os extratos testados em concentrações diferentes nos ensaios, sendo 5 µg/mL para antimalárico e 50 µg/mL para anticâncer) apresentou 86 cepas ativas com 38,17% ativas em algum dos ensaios. Vale destacar que apenas 3,82% dos extratos apresentaram ação antimalárica na análise 5x50, ressaltando este perfil de atividade como o evento mais raro observado. Deste estudo, as cepas BRB-002, BRB-004 e BRB-096 demonstram-se interessantes para o estudo sequencial da atividade anticâncer. Para a atividade antimalárica, as cepas mais interessantes são BRB-241 e BRB-598.

**Palavras-chave:** Produtos naturais marinhos; actinobactérias; atividade anticâncer; atividade antimalárica; potencial biotecnológico.

## ABSTRACT

Marine microorganisms have been highlighted as an important source of compounds with pharmacological potential. In this context, our research group, for over a decade, has been active bioprospecting Brazilian marine microorganisms and has a strain bank with more than 1,500 bacteria. Among them, those that produce substances with anti-cancer potential have been already recognized. And now, there is an interest in accessing the strain bank for antimalarial activity. Therefore, the aim of this work is to compare, based on qualitative parameters, the anticancer and antimalarial potentials of extracts obtained from bacteria recovered from marine sediment deposited in the strain bank of the Marine Pharmacology Laboratory, ICB, USP. Information on the 131 strains analyzed in the present study was accessed through the strain bank of the Marine Pharmacology Laboratory, which includes the means, method and collection site, in addition to the inhibitory activity on the growth of HCT-116 tumor cells in culture. The antimalarial activity data of the extracts were generated and provided by the collaborating research group. Two scatter plots of % of growth inhibition of the parasite (antimalarial activity) X% of growth inhibition of the tumor cell (anti-cancer activity) were made to help visualize the extracts with the most interesting biological activity profile. The strains were also organized by means, method and place of collection. Strains recovered from sediment collected in the Ubatuba region were the most numerous in this study. Strains recovered by the M2 method and the SWA medium were predominant, their combination being responsible for 39,7% of the total strains analyzed. From the anticancer activity data and the antimalarial data for each extract, it was possible to construct two scatter plots; the first, 5x5 (comparing the extracts tested at the same concentration of 5 µg/mL in both tests) had 55 active strains, of which 30,5% were active exclusively in one of the two biological assays. The second graph, 5x50 (comparing the extracts tested in different concentrations in the assays, with 5 µg/mL for antimalarial and 50 µg/mL for anticancer) showed 86 active strains with 38,17% active in some of the tests. It is worth noting that only 3,82% of the extracts showed antimalarial action in the 5x50 analysis, highlighting this activity profile as the rarest event observed. From this study, strains BRB-002, BRB-004 and BRB-096 prove to be interesting for the sequential study of anticancer activity. For antimalarial activity, the most interesting strains are BRB-241 and BRB-598.

**Keywords:** Marine natural products; actinobacteria; anticancer activity; antimalarial activity; biotechnological potential.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Moléculas isoladas de organismos marinhos aprovadas como fármacos anticâncer .....	2
<b>Figura 2:</b>	Local de ocorrência e percentual relativo ao número de cepas de bactérias marinhas que constituem o banco de cepas depositadas junto ao grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP .....	7
<b>Figura 3:</b>	Representação esquemática das etapas empregadas pelo grupo de pesquisas para a obtenção dos extratos brutos das bactérias de origem marinha depositadas no banco de cepas (1) e realização dos ensaios para avaliação da atividade biológica visando aferir o potencial anticâncer (2) ou antimalárico (3) de cada extrato obtido (destacado ao centro do esquema) .....	9
<b>Figura 4:</b>	Recorte da planilha de organização das informações relativas às bactérias de origem marinha e os respectivos extratos delas obtidos depositadas no banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP .....	10
<b>Figura 5:</b>	Diagrama da estratégia de plotagem dos dados de atividade dos extratos obtidos de cada bactéria depositada do banco de cepas, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica no eixo X e o valor para atividade anticâncer no eixo Y. O diagrama permitirá melhor visualização dos dados e indicará o perfil de atividade biológica de cada extrato analisado, reconhecendo-lhes em um de cada quadrante do gráfico.....	12
<b>Figura 6:</b>	Distribuição (percentual; número absoluto) de cepas por local de origem (A) e distribuição das cepas quanto ao meio de cultura e método através dos quais foram recuperadas do sedimento marinho (B).....	13
<b>Figura 7:</b>	Dados de atividade biológica dos extratos obtidos de cada cepa de bactéria analisada, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica a 5 µg/mL no eixo X e o valor para atividade anticâncer a 5 µg/mL no eixo Y. O quadrante 1 na parte superior direita está os extratos ativos nas duas atividades biológicas; o quadrante 2 na parte inferior direita está os extratos ativos apenas na atividade antimalárica; no quadrante 3 na parte inferior esquerda está os extratos inativos nos dois ensaios; e no quadrante 4 na parte superior esquerda está os extratos ativos apenas na atividade anticâncer.....	15
<b>Figura 8:</b>	Porcentagem dos extratos testados, separados de acordo com a atividade anticâncer, atividade antimalárica, atividade em ambos os ensaios e inatividade do gráfico 5x5 µg/mL (A). Relação entre o total de extratos isolados e o total de extratos ativos para cada localidade de onde as cepas foram recuperadas (B). Distribuição das cepas que apresentaram atividade em ambos os ensaios no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (C). Distribuição das cepas que apresentaram atividade antimalárica no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (D). Distribuição das cepas que apresentaram atividade anticâncer no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (E) .....	16
<b>Figura 9:</b>	Dados de atividade biológica dos extratos obtidos de cada cepa de bactéria analisada, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica a 5 µg/mL no eixo X e o valor para atividade anticâncer a 50 µg/mL no eixo Y. O quadrante 1 na parte superior direita está os extratos ativos nas duas atividades biológicas; o quadrante 2 na parte inferior direita está os extratos ativos apenas na atividade antimalárica; no quadrante 3 na parte inferior esquerda está os extratos inativos nos dois ensaios; e no quadrante 4 na parte superior esquerda está os extratos ativos apenas na atividade anticâncer.....	17
<b>Figura 10:</b>	Porcentagem dos extratos testados, separados de acordo com a atividade anticâncer, atividade antimalárica, atividade em ambos os ensaios e inatividade do gráfico 5x50 µg/mL (A). Relação entre o total de extratos isolados e o total de extratos ativos para cada localidade de onde as cepas foram recuperadas (B). Distribuição das cepas que apresentaram atividade em ambos os ensaios no gráfico 5x50 µg/mL quanto ao meio de	



cultura e método de isolamento (C). Distribuição das cepas que apresentaram atividade antimalárica no gráfico 5x50µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (D). Distribuição das cepas que apresentaram atividade anticâncer no gráfico 5x50µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (E)..... **18**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	10
3. METODOLOGIA .....	10
4. RESULTADOS .....	12
5. DISCUSSÃO .....	18
6. CONCLUSÃO .....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24

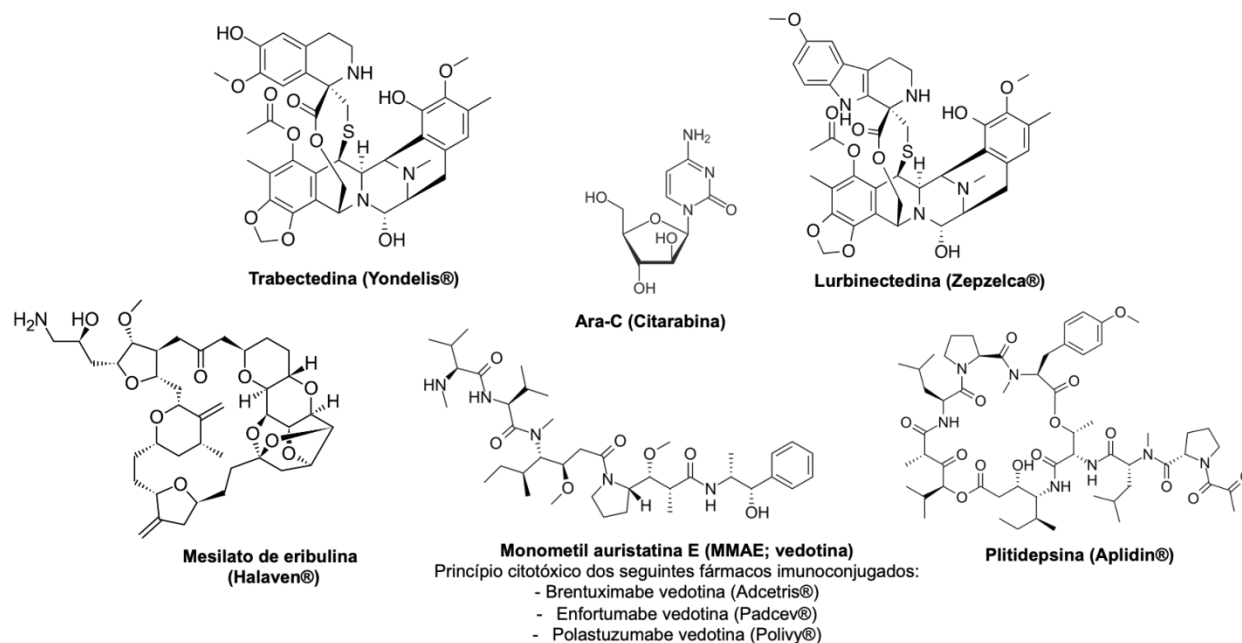
## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes para diversas áreas da ciência que trazem inovações, principalmente para a produção de fármacos. Há uma estimativa de que aproximadamente 80% dos fármacos em utilização são produtos naturais ou sintetizados a partir deles. A grande maioria das substâncias tem origem desde organismos terrestres, principalmente plantas e micro-organismos, como fungos e bactérias (Costa-Lotufo et al., 2009; Barreiro & Bolzani, 2009). Porém a quantidade de moléculas de origem terrestre vem caindo, diminuindo assim o interesse das empresas e indústrias farmacêuticas (Fenical & Jensen, 2006). Os ambientes marinhos, antes postos de lado devido ao difícil acesso por causa da profundidade, com o desenvolvimento e avanço de tecnologias (como por exemplo, o equipamento de mergulho) começaram a ser explorados. Produtos naturais marinhos, além de serem diversos, têm estruturas interessantes e uma ampla diversidade de alvos moleculares não vistas antes em moléculas de origem terrestres, aumentando o interesse farmacológico (Costa-Lotufo et al., 2009).

Os ecossistemas marinhos ocupam mais de 2/3 da superfície do planeta e abrigam a maior biodiversidade filética e uma grande diversidade química, tendo um enorme potencial biotecnológico. Inicialmente as moléculas bioativas foram obtidas a partir de organismos majoritariamente sésseis como esponjas não calcárias, ascídias, corais moles, algas e também alguns grupos de moluscos sem concha e estão no momento em estudos pré-clínicos ou clínicos. Até o momento, há 13 fármacos já aprovados para uso clínico que foram desenvolvidos desde substâncias obtidas de organismos de origem marinha. Esses fármacos vêm sendo empregados como antivirais, analgésicos, anti-hipertriglicemiantes e, majoritariamente, anticâncer.

Na área de fármacos anticâncer originados a partir de organismos marinhos, temos 8 fármacos utilizados clinicamente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), European Medicine Agency (EMA) e Therapeutic Goods Administration (TGA), cujas estruturas químicas estão destacadas na figura 1. O primeiro medicamento anticâncer de origem marinha foi aprovado em 1969, tendo sido o ara-C (Citarabina®), um análogo sintético de moléculas isoladas a partir de derivados dos arabinonucleosídeos da esponja caribenha *Cryptotethya crypta*. Outros fármacos mais recentes, como a fludarabina (Fludara®), um agente antineoplásico com análogo da purina F-ara-A, e a nelarabina (Arranon®), também um nucleosídeo de purina, foram desenvolvidos com base neste racional, e são utilizados para tratamento de leucemias e linfomas. A trabectedina

(Yondelis®) e a lurbinectedina (Zepzelca®), alcalóides tetra-hidroquinolínicos, sendo o primeiro o produto natural isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* e posteriormente obtida desde um processo semi sintético a partir do antibiótico cianosafracina B produzido pela da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, e o segundo, um derivado sintético da trabectedina, foram aprovados em 2007 e 2020, respectivamente, para o tratamento de câncer. Mais além, o melisato de eribulina (Halaven®), um análogo sintético da halicondrina B, molécula isolada da esponja *Halicondrina okadae*, e a plitidepsina (Aplidin®), um depsipeptídeo cíclico isolado do tunicado *Aplidium albicans*, estão em uso clínico desde 2010 e 2018, respectivamente. E, finalmente, a monometilauristatina E (MMAE), um derivado sintético dos peptídeos dolastatinas, isolados do molusco *Dolabella auricularia* mas cujo organismos produtores são cianobactérias incorporadas pela dieta do molusco, é o princípio citotóxico de 3 fármacos imunoconjugados: a brentuximabe vedotina (Adcetris®), a enfortumabe vedotina (Padcev®) e a polatuzumabe vedotina (Polivy®) (Molinski et al., 2009; Costa-Lotufo et al., 2009; Jimenez et al., 2018; Jimenez et al., 2020; Wang et al., 2020).



**Figura 1.** Moléculas isoladas de organismos marinhos aprovadas como fármacos anticâncer.

Vale ressaltar que parte dos metabólitos isolados de macro-organismos marinhos seria, na verdade, produto da associação com micro-organismos (Costa-Lotufo et al., 2009; Montaser & Luesch, 2011) que, por sua vez, desenvolveram estratégias

metabólicas singulares, e possuem altas capacidades adaptativas. Dentre os micro-organismos marinhos, as bactérias são uma fonte de alto potencial para a produção de metabólitos secundários com importantes propriedades farmacológicas. Dentre eles podemos destacar as actinobactérias como responsáveis por grande parte dessa produção (Jensen et al., 2005; Barreiro & Bolzani, 2009). Particularmente, as actinobactérias (ou actinomicetos) são bactérias Gram-positivas de maioria filamentosa com alta capacidade de produção de metabólitos secundários com funções biológicas interessantes. De fato, os actinomicetos terrestres são muito estudados e já se produziram medicamentos antimicrobianos, anticâncer e imunossupressores. Mesmo que as actinobactérias do solo continuem como uma importante fonte de novas moléculas bioativas, as actinobactérias marinhas, ainda pouco exploradas em relação ao seu análogo terrestre, vêm demonstrando ser fontes promissoras de metabólitos secundários com utilidade biomédica.

Microbiologicamente, os oceanos representam um ambiente altamente complexo e diversificado, com abundâncias estimadas em um milhão de micro-organismos por mL de água do mar e um bilhão por cm<sup>3</sup> de sedimento (Fenical & Jensen, 2006). O fato de que as actinobactérias marinhas viverem no oceano faz com que enfrentem adversidades ambientais diferentes das terrestres e, conseqüentemente, seus produtos naturais detêm traços estruturais únicos e complexos que são raramente ou nunca encontradas nos compostos isolados de origem terrestre (Zotchev, 2012; Fenical & Jensen, 2006; Jensen et al., 2005). Assim, os micro-organismos marinhos desenvolveram estratégias metabólicas únicas. Eles vivem em um ambiente de alta competição biológica, induzindo-os a adaptação e a produzir respostas rápidas de defesa e sobrevivência que acabam gerando metabólitos secundários particulares do ambiente marinho que possuem valor biotecnológico e farmacêutico (Costa-Lotufo et al., 2009; Zhang et al., 2005).

Ainda que não haja ainda nenhuma substância desta origem aprovada para uso clínico, há diversas moléculas obtidas de actinobactérias marinhas que são promissoras por seu potencial anticâncer. Nesse contexto, merece destaque a salinosporamida A (Marizomib®), obtida de *Salinispora tropica*. Esta substância está atualmente em fase 3 de testes clínicos para tratamento de mieloma múltiplo, linfomas e gliomas.

Mais além, a cepa *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-97 demonstrou ação citotóxica contra linhagens de células COLO 320 DM e VERO com 100 µg/ml do extrato, além de atividade antibacteriana (Al-Dhabi et al., 2020). A pirroloformamida é uma substância

bioativa extraída da actinobactéria *Streptomyces sp.* associada ao tunicado endêmico do litoral nordeste do Brasil, *Eudistoma vannamei*. Ela atua como um modulador da citocinese. A linhagem PC3M de câncer de próstata foi a mais sensível, com uma IC<sub>50</sub> de valor 1,67 µM (Abreu et al., 2014). Outra substância de *Streptomyces sp.* promissora é a cromomicina A2 (ou aburamicina A), um ácido aureólico que provocou autofagia em células da linhagem do melanoma MALME-3M com uma IC<sub>50</sub> de 16,7 nM (Guimarães et al., 2014). Extraída da *Micromonospora sp.* associada a *Eudistoma vannamei*, as antraciclinonas 1 e 4 apresentaram IC<sub>50</sub> de 12,7 µM e 6,2 µM, respectivamente, para a linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano HCT-8 (Sousa et al., 2012). O depsipeptídeo cíclico ohmyungsamicina A, extraído da cepa de *Streptomyces sp.*, apresentou citotoxicidade em linhagens de câncer de cólon, pulmão, estômago, mama e fígado com IC<sub>50</sub> entre 0,359 e 0,816 µM (Um et al., 2012). A urukthapelstatin A, um peptídeo cíclico, é um bioativo obtido da actinobactéria *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542 inibiu o crescimento de células de câncer de pulmão humano A549 com valor de IC<sub>50</sub> de 12 nM. Também teve atividade citotóxica com outras linhagens celulares como MCF-7, HCT-116, DMS114 e NCIH460 (Matsuo et al., 2007).

Não apenas por suas propriedades anticâncer, a natureza é ainda fonte de substâncias com propriedades antimaláricas, sendo que diversos fármacos antimaláricos originados da natureza foram, em sua maioria, obtidos de plantas terrestres. Uma das primeiras substâncias a serem utilizadas para o tratamento da malária é a quinina, alcalóide isolado da casca da árvore sul-americana *Cinchona (Arbor febrifuga)*. Outros fármacos que podemos citar são a cloroquina e mefloquina, ambas derivadas de quinina. A artemisinina (Qinghaosu) é um endoperóxido de lactona sesquiterpeno obtida da folha da planta medicinal chinesa qinghao (*Artemisia annua L.*). Sua utilização antiplasmodial foi descrita no Handbook of Prescriptions for Emergencies em meados do século IV na China. A descoberta da artemisinina e seus derivados foi de tanta importância que Tu Youyou, química farmacêutica e médica, professora da Universidade do Centro de Ciências Médicas da Universidade de Pequim recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina 2015. Todavia, a resistência de diversas espécies de *Plasmodium sp.* coloca em desuso alguns medicamentos, como por exemplo, a cloroquina. Por isso, a busca por novas substâncias naturais antimaláricas é necessária, sendo que o ambiente marinho e, inclusive, as actinobactérias marinhas, estão demonstrando ser uma fonte interessante

(Na-Bangchang & Karbwang, 2019; Tajuddeen & Van Heerden, 2019; Fattorusso & Taglialatela-Scafati, 2009).

Neste contexto, pesquisas bioprospectivas estão sendo realizadas para encontrar metabólitos antimaláricos e alguns deles mostram-se promissores. O produto natural manzamina A foi inicialmente isolada da esponja Indo-Pacífico *Acanthostrongylophoraingens*. Esta substância demonstrou atividade significativa contra *Plasmodium falciparum*, com atividade de 2 a 7 vezes maior quando comparada com artemisinina *in vitro*. Mas após o estudo da microbiota presente na esponja, descobriu-se que a *Micromonospora sp.* era a responsável pela produção da manzamina A (Waters et al., 2014). McCarthy e colaboradores (2019) identificaram alguns actinomicetos que apresentaram atividade inibitória com  $IC_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$  contra cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina. A salinosporamida A isolada da *Salinispora tropica*, conhecida por ter atividade anticancerígena, também foi avaliada contra o parasita humano da malária. O composto demonstrou inibição com uma  $IC_{50}$  de 11,4 nM na cultura *in vitro*, inibindo os estágios eritrocíticos do ciclo da malária (Prudhomme et al., 2008, Gademann & Kobylinska, 2009). Tajuddeen & Van Heeden (2019) compilaram alguns produtos naturais antimaláricos de fontes marinhas. O composto marianacarbolina A isolado de *Marinactinospora thermotolerans*, presente no mar da China Meridional, que foi ativo contra cepas de *Plasmodium* resistente e sensível à cloroquina. A antraquinona obtida de um extrato bruto de *Streptomyces sp.* tailandês com  $IC_{50}$  de 1,45 – 3,56  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . E também, o metabólito actinoramida A isolada do *Streptomyces bangulaensis* da Papua Nova Guiné que apresentou ação submicromolar contra cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis à cloroquina.

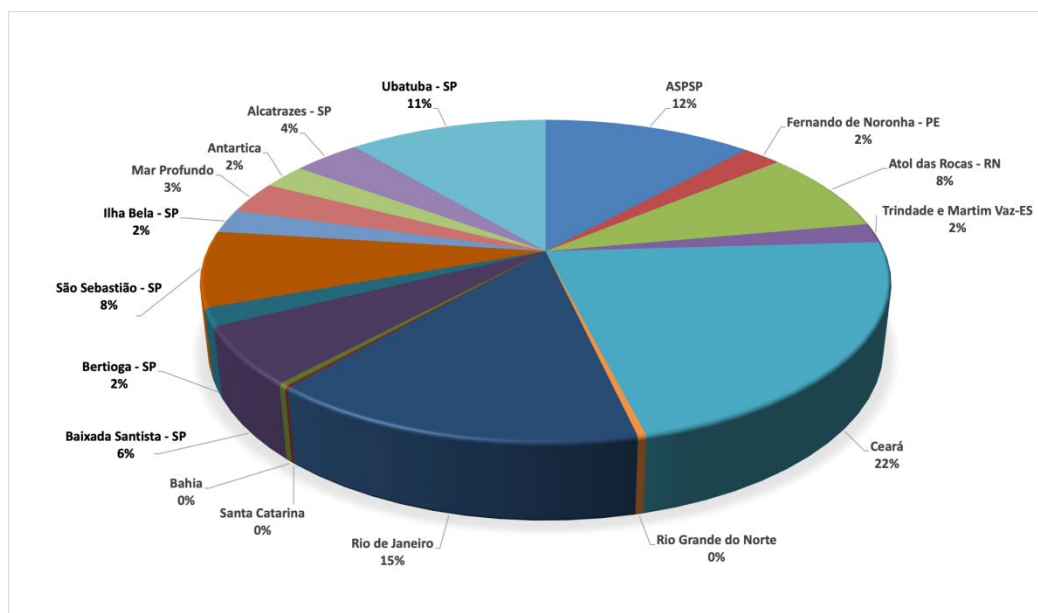
O Brasil possui a maior linha costeira da América do Sul contando com mais de 8.000 km, variando desde o Equador até o sul do Trópico de Capricórnio. Esta posição é privilegiada para a busca de produtos naturais por possuir uma excelente e ainda não descoberta biodiversidade marinha (Newman, 2017; Berlinck et al., 2017). A bioprospecção de micro-organismos marinhos no Brasil está em crescimento, o que pode ser verificado pelo aumento de produções científicas, estruturação de grupos e redes de pesquisa e depósitos de patentes (Costa-Lotufo et al., 2009, Wilke et al., 2020).

Como exemplos, pode-se citar, inicialmente, o estudo realizado por Arthaud et al. (2012), que avaliou a diversidade e o potencial biotecnológico de micro-organismos associados ao sedimento da costa nordeste do Brasil. Foram isoladas 32 cepas de

bactérias de amostra de sedimento da praia da Taíba, onde 13 foram selecionadas para extração e atividade citotóxica. Dentre elas, 4 apresentaram atividade biológica e inibitória contra a proliferação de células tumorais na concentração de 50 µg/mL. Outro estudo realizado com micro-organismos brasileiro foi de Laport et al. (2017), onde foram avaliadas interações antagônicas entre cepas de bactérias sobre a produção de substâncias antimicrobianas, com pelo menos um gênero bacteriano isolado de *Oscarellas sp.* Foi isolado um total de 407 cepas. Dentre elas, 85 cepas foram selecionadas para interações antagônicas e foram testadas contra bactérias de importância médica, onde 27 bactérias marinhas demonstraram atividade inibitória em pelo menos um teste. Outros artigos de revisão como de Thompson et al. (2018), Berlinck et al. (2004), Lôca et al. (2014) e Newman (2017) trazem mais sobre o potencial biotecnológico da diversidade brasileira.

O nosso grupo de pesquisas, há mais de uma década, ocupa-se do reconhecimento do potencial biotecnológico de micro-organismos marinhos brasileiros a partir da identificação de cepas capazes de produzir substâncias com propriedades anticâncer. Neste contexto, o grupo já conta com um banco de cepas com mais de 1.500 bactérias recuperadas tanto de invertebrados marinhos como de amostras de sedimento coletados na costa ou ilhas do Brasil (Figura 2). Entre as moléculas encontradas, merecem destaque as antraciclinonas inéditas isoladas de uma cepa de *Micromonospora sp.* (Sousa et al., 2012; Jimenez et al., 2013) e as cromomicinas isolada de diferentes cepas de *Streptomyces sp.* recuperadas de sedimento marinho, sendo que a cromomicina A2 demonstrou-se indutora de autofagia em células de melanoma metastático (Guimarães et al., 2014), e a cromomicina A5 apresentou capacidade de interagir com o fator de transcrição TBX2, que tem grande relevância no processo de carcinogênese, sobremaneira por atribuir características metastáticas às células (Sahm et al., 2020).



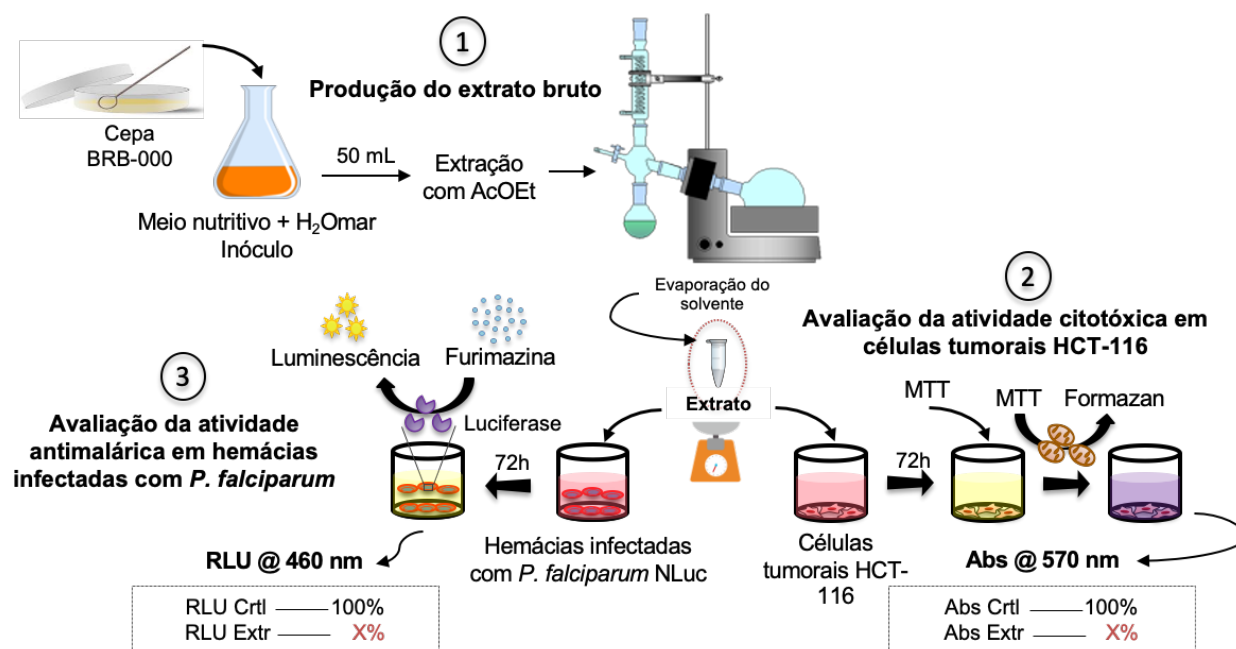


**Figura 2.** Local de ocorrência e percentual relativo ao número de cepas de bactérias marinhas que constituem o banco de cepas depositadas junto ao grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP.

As bactérias depositadas neste banco de cepas são conservadas em ultra-freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  em criotubos devidamente rotulados contendo solução contendo água do mar reconstituída, meio de cultura rico em nutrientes e 25% de glicerol, como criopreservante. Até o momento, a conservação das cepas nestas condições tem viabilizado a sua reativação para estudos sequenciais. Assim, as bactérias recuperadas das diferentes matrizes e localidades do litoral brasileiro podem ser recorrentemente acessadas. De modo geral, as bactérias dali foram crescidas em meio líquido e extraídas em solvente orgânico para obter-se o respectivo extrato bruto que, por sua vez, foram testados por sua capacidade antiproliferativa contra células do carcinoma colo-retal humano em cultura HCT-116 às concentrações de 5 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , após 72h horas de exposição, pelo ensaio do MTT. Este ensaio consiste numa análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis baseado na redução do MTT, um sal de tetrazolina(3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolinabromida) de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade de enzimas desidrogenases e redutases presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (Mosmann, 1983), esquematizado na figura 3. Desta forma, a citotoxicidade de cada extrato é inversamente proporcional à quantidade de formazan produzido, visto que menos formazan será detectado quando restarem um menor número de células, refletindo, pois, as propriedades citotóxicas do respectivo extrato. Os percentuais de inibição do crescimento das células expostas aos extratos são

determinados relativamente ao crescimento das células do grupo controle, que não sofrem qualquer interferência. Para os fins desta triagem, consideram-se mais relevantes por sua citotoxicidade, os extratos que inibam acima de 75% do crescimento celular. A partir deste parâmetro, cerca de 35% dos extratos obtidos das cepas de bactérias depositadas no banco são considerados citotóxicos.

Entretanto, há o interesse de acessar este banco de cepas por seu potencial em outras atividades biológicas. Neste contexto, mais recentemente, os extratos obtidos das bactérias passaram ainda a ser testados por suas propriedades antimaláricas, aferindo a capacidade destes de interferirem em algum estágio do ciclo infeccioso do parasita *Plasmodium falciparum* mantidos *in vitro* com hemácias humanas. Até o momento, 131 extratos foram testados na concentração de 5 µg/mL, sendo os parasitas também expostos durante 72h. Para esta aferição, foi utilizada a linhagem transgênica de *P. falciparum* Pf3D7-135 pEF-8P1-NLuc, que expressa uma luciferase como proteína repórter (neste caso, a nanoluciferase ou NLuc) (Azevedo et al., 2014), sendo que este ensaio também está esquematizado na figura 3. As luciferases, por sua vez, são enzimas responsáveis pela bioluminescência presente naturalmente em alguns organismos e foram adaptadas à expressão em outros organismos que são recorrentemente utilizados como modelos biológicos e outras ferramentas científicas (Che et al., 2012). Tais enzimas catalisam uma reação sobre um substrato que culmina na emissão de luz, sendo que a NLuc, obtida de *Oplophorus gracilirostris*, camarões marinhos que habitam águas profundas, demonstrou ser até 100 vezes mais sensível que outras luciferases mais típicas, como aquelas obtidas de *Photinuspyralis* (FLuc) e *Renilla reniformes* (RLuc) (England, Ehlerding, Cai, 2016). Neste caso, a partir deste modelo, os extratos que tenham atividade antimalárica, reduzirão o número dos parasitas e, logo, a quantidade de enzimas NLuc capazes de metabolizar o substrato fumirazina e emitir luz. Logo, a quantidade de luz emitida é diretamente proporcional à quantidade de parasitas remanescentes, e inversamente proporcional ao efeito antimalárico do extrato.



**Figura 3.** Representação esquemática das etapas empregadas pelo grupo de pesquisas para a obtenção dos extratos brutos das bactérias de origem marinha depositadas no banco de cepas (1) e realização dos ensaios para avaliação da atividade biológica visando aferir o potencial anticâncer (2) ou antimalárico (3) de cada extrato obtido (destacado ao centro do esquema).

Diante disso, este estudo pretende comparar os potenciais antimaláricos e anticâncer dos extratos obtidos das bactérias do banco de cepas, visando identificar os extratos dotados de ambos os potenciais, tanto anticâncer como antimalárico, bem como os extratos ativos em apenas um dos ensaios. Ao passo que a maior parte dos extratos foram testados por seu potencial anticâncer, mas apenas uma fração deles foram testados quanto ao seu potencial antimalárico, este estudo apenas poderá realizar o comparativo entre os extratos que já foram submetidos a ambos os testes. Entretanto, este trabalho tem o potencial de estabelecer um sistema para futuras análises comparativas entre os extratos, tanto com os seguintes que forem submetidos a avaliação de atividade antimalárica, como entre outras atividades biológicas que, porventura, venham a ser acessadas deste banco de cepas. A estratégia de comparação entre os extratos é um meio de obter-se ainda mais informações acerca do potencial biotecnológico das bactérias ali depositadas, visto que produzirá novas informações sobre estes extratos e respectivas bactérias, assim como subsidiará escolhas quanto aqueles mais relevantes para futuros estudos nesta linha.

## 2. OBJETIVO

Comparar, a partir de parâmetros qualitativos, os potenciais anticâncer e antimalárico dos extratos obtidos de bactérias marinhas depositadas no banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP, visando identificar aqueles com melhor potencial para prosseguimento do estudo de atividade biológica.

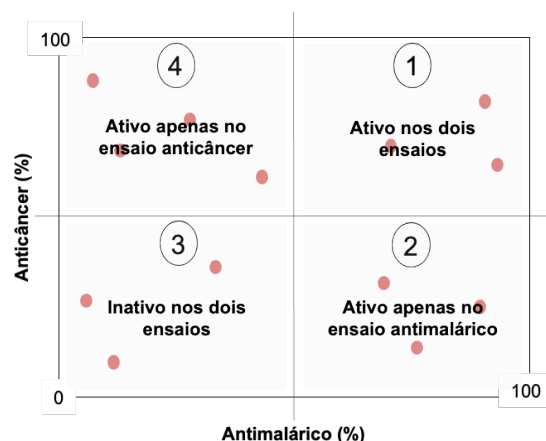
## 3. METODOLOGIA

Os dados oficiais relativos a cada bactéria recuperada do ambiente marinho bem como as atividades aferidas desde o respectivo extrato estão organizados em uma planilha que é constantemente atualizada por membros do grupo sempre que há produção de novos dados relevantes neste contexto. Como mostrado no recorte apresentado na figura 4, esta planilha armazena, essencialmente, informações acerca das bactérias ali depositadas, como local de coleta, meio e método de recuperação das bactérias desde a matriz de onde esta foi obtida (informações estas contidas sob a coluna intitulada “code”, que, por sua vez remete à informações codificadas de acesso aos mantenedores da planilha), algumas características fenotípicas, a localização de armazenamento da cepa no ultra-freezer que abriga o banco e a nomeação atribuída à cepa referente à ordem em que esta foi depositada no banco (sob a coluna intitulada “name”, este nome inicia-se com as letras BRA ou BRB, e segue-se com 3 números). Mais além, informações sobre os respectivos extratos também constam na planilha, na forma da massa de extrato obtido (a partir da extração de 50 mL de meio de cultura crescido com a respectiva bactéria e extraído com o solvente acetato de etila por 2h, sob agitação) e o percentual de inibição do crescimento da linhagem celular HCT-116 em cultura em cada concentração aferida (5 e 50 µg/mL).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Name	CODE	ORIGIN	DESCRIPTION	FERMENTATION PERIOD	EXTRACT	FREEZER -80°C	VIALS	EPENDORF WEIGHT (g)	SAMPLES WEIGHT (mg)	EXTRACT 5 ug	EXTRACT 50 ug		
BRB-001	AM01-M2-SWA-F	Santos	Bactéria branca, com textura de giz. Deixa o meio envolta dela e seu fundo marrom	ND	YES	Caixa 1	8	1.0575	3.4	25	34	20.6	35.9
BRB-002	AM07-M2-SWA-A	Santos	Bactéria branca com o verso preto. Deixa o meio de cultura marrom	ND	YES	Caixa 1	8	1.0533	19.1	89.4	105.3	77.4	64.8
BRB-003	AM06-M1-SWA-C	Santos	Bactéria laranja com esporos pretos. Aparência rugosa	ND	YES	Caixa 1	8	1.0586	5.2	10	17.9	95.6	99.9
BRB-004	AM01-M2-SWA-C	Santos	Bactéria branca com o fundo verde escuro. Deixa tanto o meio sólido quanto o meio líquido amarronzado. Formação de colônias arredondadas	ND	YES	Caixa 1	8	1.1105	11.5	103.3	101.6	101.9	97.2
BRB-005	AM04-M1-A1-A	Santos	Bactéria laranja com aspecto de gram-negativa. Deixa o meio líquido alaranjado.	ND	YES	Caixa 1	8	A- 1.0814	2.5	17.6	-3.4	8.1	0.4
BRB-006	AM06-M1-SWA-B	Santos	Bactéria laranja com aparência “seca” e de crescimento lento.	ND	YES	Caixa 1	8	B- 1.0881	5.9	30.2	9.3	104.8	105.2
BRB-007	AM08-M1-TM-C	Santos	Bactéria bege com esporos brancos. Deixa o meio de cultura levemente bege	ND	YES	Caixa 1	8	1.0864	7.1	35.7	28.3	105.7	103
BRB-008	AM08-M1-SWA-B	Santos	Bactéria amarela com esporos brancos e cinzas	ND	YES	Caixa 1	8	1.0858	4.6	17.3	0.2	0.1	-5.9
BRB-009	AM06-M2-SWA-A	Santos	Bactéria branca com fundo marrom claro. Deixa o agar levemente amarronzado.	ND	YES	Caixa 1	8	A- 1.0582	67.4	26.2	3.2	106.2	104.4
BRB-010	AM03-M1-TM-B	Santos	Bactéria amarela com esporos brancos que posteriormente se tornam cinzas. Formam colônias circulares	ND	YES	Caixa 2	8	B- 1.1081	32.2				
								1.0755	8.5	28.5	8.7	21.1	1.6

**Figura 4.** Recorte da planilha de organização das informações relativas às bactérias de origem marinha e os respectivos extratos delas obtidos depositadas no banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP.

Os dados para atividade antimalária dos extratos foram cedidos pelo Prof. Mauro Azevedo, do Depto. De Biociências na UNIFESP, Campus Baixada Santista, e se referiam à inibição do crescimento do parasita *P. falciparum* frente a 5 µg/mL de cada extrato. As análises realizadas neste estudo foram de natureza qualitativa. Inicialmente, os dados do percentual de inibição do crescimento celular induzidos por cada concentração testada dos extratos obtido das bactérias depositadas no banco de cepas que também tenham sido analisados por seu potencial antimalárico foram extraídos da planilha oficial. Estes dados foram planilhados novamente para organização num novo grupo de dados, relacionados pelo nome atribuído à respectiva cepa ("BRB-000"), o valor percentual médio da atividade citotóxica e o valor percentual médio da atividade antimalária. Então, gráficos para melhor visualização do perfil de cada extrato foram confeccionados ao plotar o valor percentual da respectiva atividade antimalária a 5 µg/mL no eixo X e o valor análogo para a atividade citotóxica no eixo Y, nas concentrações de 5 e 50 µg/mL. Este gráfico permitiu distribuir os extratos entre os quadrantes e, assim, reconhecê-los por um dos seguintes perfis, diagramados na figura 5: 1) ativo nos dois ensaios; 2) ativo apenas no ensaio antimalárico; 3) inativo nos dois ensaios, e 4) ativo apenas no ensaio anticâncer. A identificação de extratos mais proeminentes que ocorreram nos quadrantes 2 e 4 (ativos apenas em um dos ensaios) foram os de maior interesse para serem explorados em busca de mais informações sobre as características dos extratos e da respectiva atividade biológica, bem como quando a informações da cepa produtora, seguido pelos extratos do quadrante 1 (ativos em ambos os ensaios).



**Figura 5.** Diagrama da estratégia de plotagem dos dados de atividade dos extratos obtidos de cada bactéria depositada do banco de cepas, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica no eixo X e o valor para atividade anticâncer no eixo Y. O diagrama permitirá melhor visualização dos dados e indicará o perfil de atividade biológica de cada extrato analisado, reconhecendo-lhes em um de cada quadrante do gráfico.

Mais além, após a categorização por seu perfeito de atividade biológica, as cepas analisadas, das quais os extratos aqui avaliados foram obtidos, também foram caracterizadas quanto ao método de pré-tratamento empregado ao sedimento antes de semeá-los nos meios semi-sólidos para isolamento das cepas, aos meios dos quais cada cepa fora recuperada e, finalmente, ao local de coleta do sedimento de onde se obteve as cepas. Todas essas informações foram extraídas da planilha oficial do banco de cepas, mostrada na figura 4.

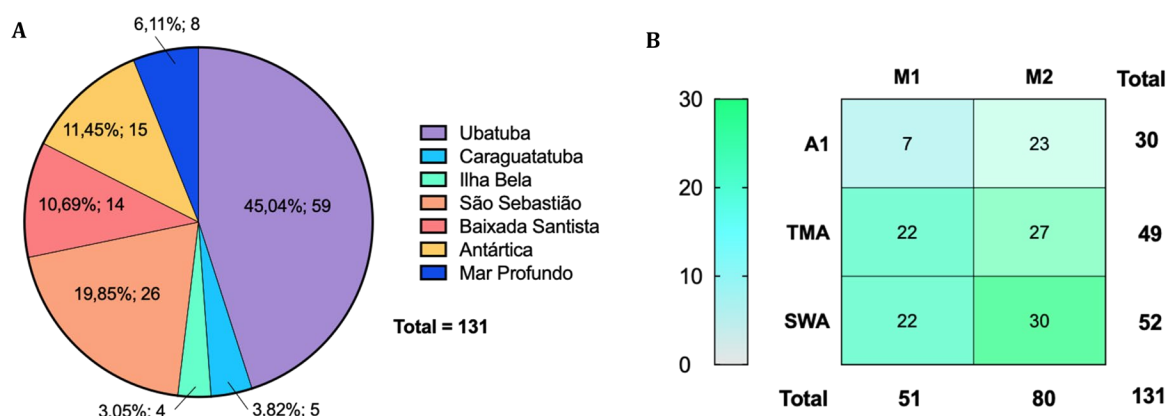
#### 4. RESULTADOS

As informações das 131 cepas de bactérias cujos extratos obtidos foram analisados no presente estudo, como local de coleta, método de pré-tratamento de sedimento e meio de cultura de recuperação das bactérias foram extraídas da planilha oficial do banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha, ICB, USP.

As cepas foram recuperadas de sedimento coletado em diferentes regiões, sendo eles Antártica, Baixada Santista, Caraguatatuba, Ilha Bela, Mar Profundo, São Sebastião e Ubatuba. Essas duas últimas regiões são responsáveis por mais da metade das cepas cujos extratos foram incluídos neste estudo, como apresentado na figura 6A. A maioria das cepas foi isolada da região de Ubatuba, com 59 cepas (45,04%). Os locais de coleta no município foram: Praia da Enseada, Praia Saco do Ribeira, Praia do Lázaro, Praia Dura, Praia da Fortaleza, Praia da Lagoinha, Praia da Maranduba, Praia da Tabatinga,

Ilha do Mar Virado; sendo a Praia do Lázaro o local com mais cepas isoladas (13). Em São Sebastião (Enseada de São Sebastião, Praia Pitangueiras, Praia Preta, Marina Grande, Praia de Araçá), das 26 bactérias estudadas, 8 foram recuperadas da Enseada.

As amostras de sedimento, antes da inoculação no meio semi-sólido, foram processadas por dois métodos diferentes, sendo M1, dessecação e carimbo, e M2, método de aquecimento e esgotamento por estrias. As cepas foram isoladas em três meios de cultivo com características distintas: A1, meio rico em nutrientes (amido, peptona, extrato de levedura e água do mar artificial); TMA, meio pobre enriquecido com metais traço (traços de glicose e extrato de levedura, metais traço, ágar e água do mar artificial); e SWA, meio mínimo (ágar e água do mar artificial). Entre os métodos e meios usados para a recuperação das cepas, M2 e SWA demonstraram-se, respectivamente, os mais efetivos, sendo a combinação destas condições, responsável pela recuperação de 39,7% das cepas, seguido pela combinação M2 e TMA, com 37,4% (figura 6B).



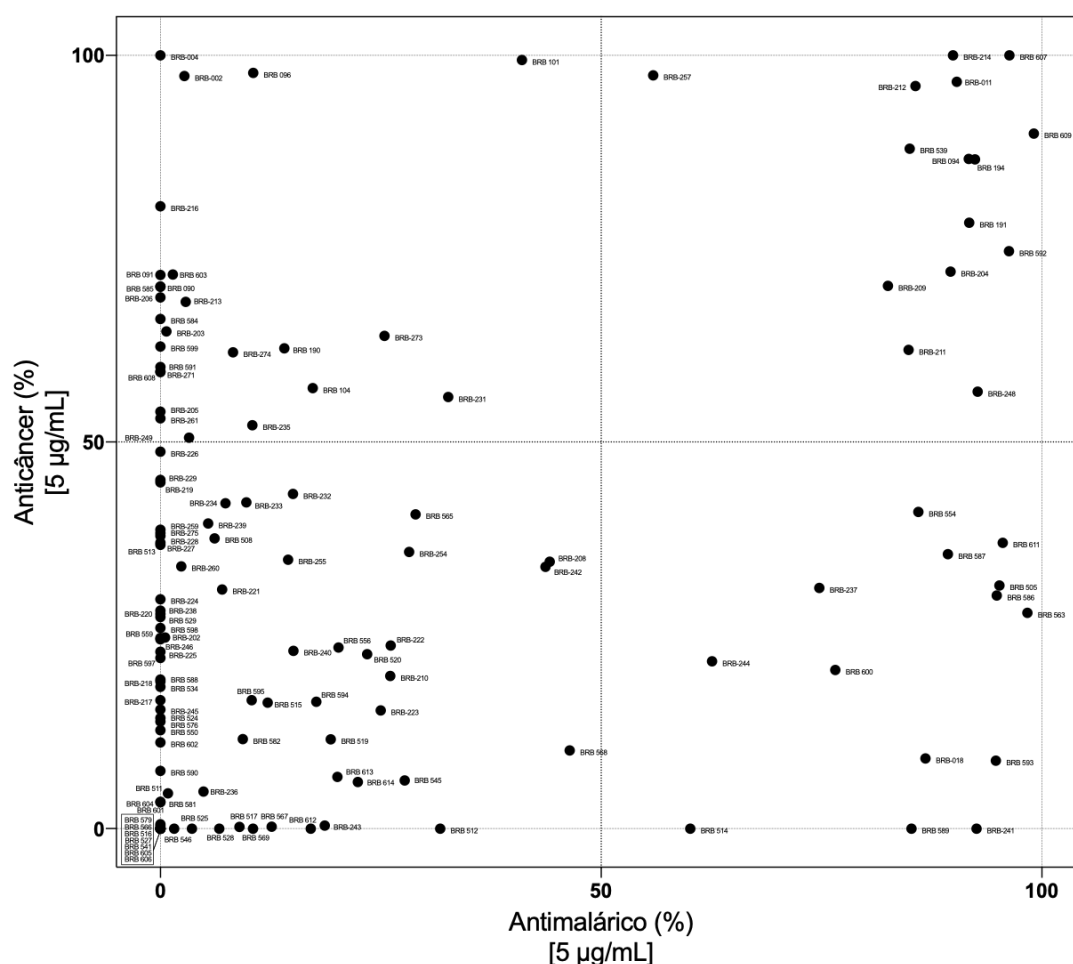
**Figura 6.** Distribuição (percentual; número absoluto) de cepas por local de origem (A) e distribuição das cepas quanto ao meio de cultura e método através dos quais foram recuperadas do sedimento marinho (B).

Quanto à atividade biológica, os dados dos extratos obtidos de cada cepa sobre inibição do crescimento das células tumorais HCT-116 (atividade anticâncer %) nas concentrações de 5 e 50 µg/mL, também foram extraídos da planilha oficial do banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha. Por sua vez, os dados dos extratos quanto a inibição da proliferação do parasita *Plasmodium falciparum* Pf3D7-135 pEF-8P1-Nluc (atividade antimalárica %) na concentração de 5 µg/mL foram cedidos pelo Prof. Dr. Mauro Ferreira de Azevedo, do Departamento de Biociências da UNIFESP, *Campus* Baixada Santista. As figuras 7 e 9 apresentam os dados de atividade biológica dos

extratos aqui analisados através de um gráfico de dispersão de pontos, sendo que a figura 7 apresenta a dispersão dos extratos por suas atividades antimalárica a 5 µg/mL x anticâncer a 5 µg/mL (5 x 5), ao passo que a figura 9 demonstra as atividades antimalárica a 5 µg/mL x anticâncer a 50 µg/mL (5 x 50).

Como mostra a figura 7, entre os extratos acessados na condição 5 x 5, 55 (42%; quadrantes 1 + 2 + 4) apresentaram atividade biológica nos ensaios. Destes, 41 (74,5% dentre os extratos ativos; quadrantes 1 + 4) demonstraram ação anticâncer, ou seja, inibição do crescimento das células tumorais acima de 50% na concentração de 5 µg/mL, sendo que 26 (47,3% dentre os extratos ativos; quadrante 4) apresentaram exclusivamente atividade anticâncer, como visto no quadrante 4. No quadrante 2 estão os 14 extratos (25,5% dentre os extratos ativos) que apresentaram apenas ação antimalárica, dentre os 29 (52,7% dentre os extratos ativos; quadrantes 1 + 2) com esta atividade. No quadrante 1 encontram-se as 15 cepas que demonstraram atividade igual ou superior a 50% em ambos os ensaios e, no quadrante 3, os extratos que foram considerados inativos.

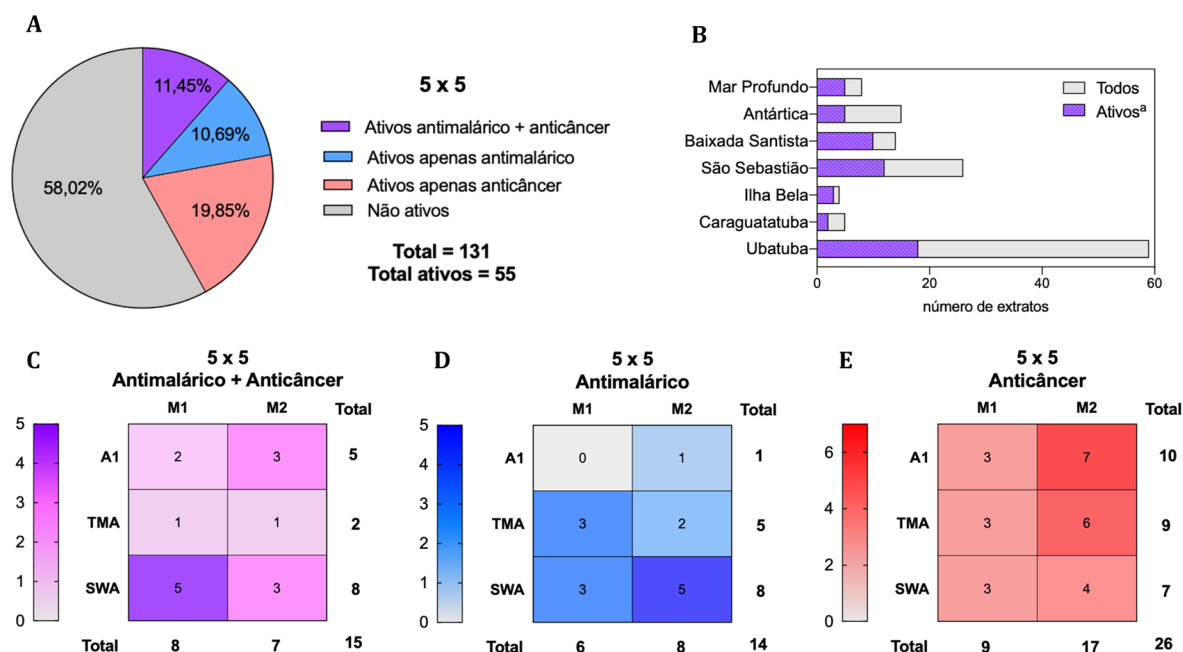




**Figura 7.** Dados de atividade biológica dos extratos obtidos de cada cepa de bactéria analisada, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica a 5 µg/mL no eixo X e o valor para atividade anticâncer a 5 µg/mL no eixo Y. O quadrante 1 (superior à direita) agrupa os extratos ativos nas duas atividades biológicas; no quadrante 2 (inferior à direita) estão os extratos ativos apenas como antimaláricos; no quadrante 3 (inferior à esquerda) estão os extratos inativos nos dois ensaios; e no quadrante 4 (superior à esquerda) contam os extratos ativos apenas como anticâncer.

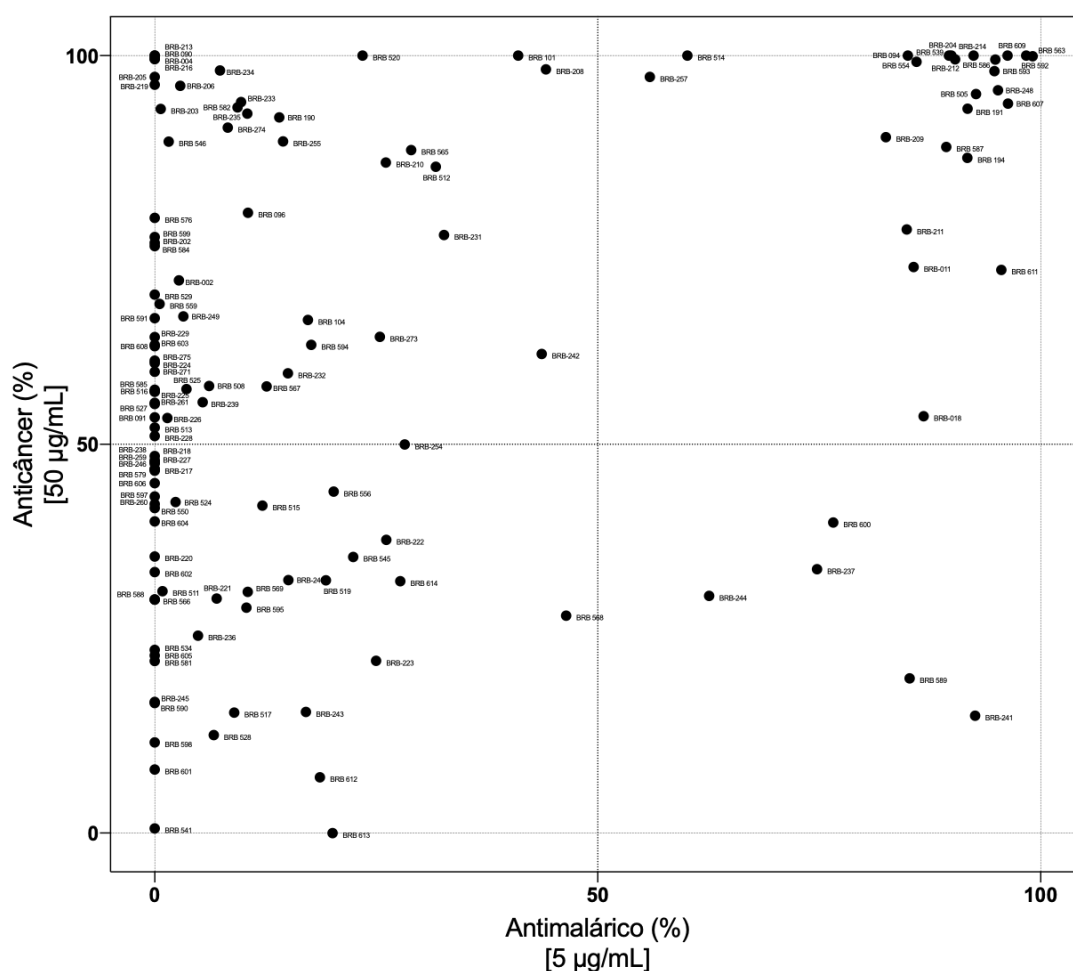
Em uma análise mais detalhada da figura 7, com o suporte da figura 8, pode-se observar que os extratos inativos correspondem a mais da metade dos extratos analisados e, dentre os 131 extratos, aqueles ativos exclusivamente em um dos ensaios representam 30,5%. Nesta análise, os extratos foram comparados por sua atividade na mesma concentração, sendo que extratos apenas anticâncer representam quase o dobro dos somente antimaláricos (figura 8A). Em números absolutos, Ubatuba foi a região que cedeu mais cepas ativas, porém esta também foi a região com o maior número de cepas testadas. Em termos percentuais, as localidades Ilha Bela, Baixada Santista e Mar Profundo apresentaram cepas dentre as quais mais da metade produziram extratos que apresentaram algum tipo de atividade (figura 8B). Quanto ao método de pré-tratamento do sedimento, apenas as cepas ativas exclusivamente no ensaio anticâncer

apresentaram grandes diferenças entre a quantidade de bactérias produtoras de extratos ativos isoladas após um ou o outro método, favorecendo o M2. Também nesse grupo de cepas encontra-se que a maioria foi recuperada do meio A1 (meio rico em nutriente), ao passo que as cepas que produziram extratos classificados nas demais condições de atividade biológica foram majoritariamente isoladas do meio SWA (meio nutricionalmente mínimo). Esses dados estão apresentados nas figuras 8C, D e E.



**Figura 8.** Porcentagem dos extratos testados, separados de acordo com a atividade anticâncer, atividade antimalárica, atividade em ambos os ensaios e inatividade do gráfico 5x5 µg/mL(A). Relação entre o total de extratos isolados e o total de extratos ativos para cada localidade de onde as cepas foram recuperadas (B). Distribuição das cepas que apresentaram atividade em ambos os ensaios no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (C). Distribuição das cepas que apresentaram atividade antimalárica no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (D). Distribuição das cepas que apresentaram atividade anticâncer no gráfico 5x5 µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (E).

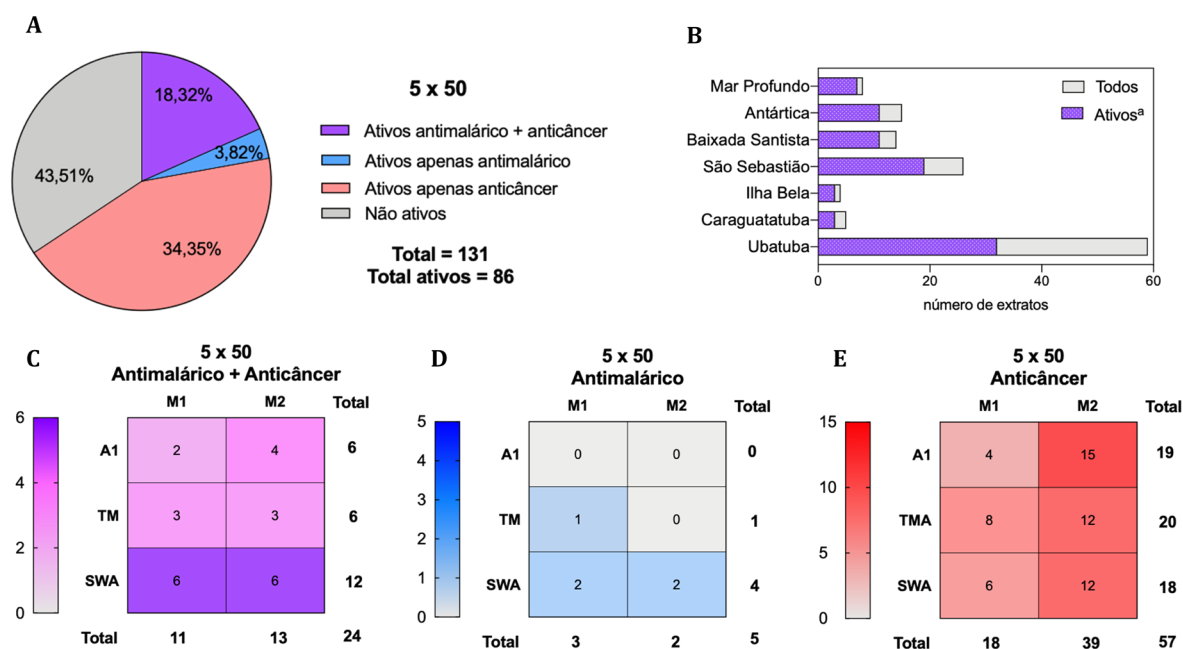
Para o gráfico 5x50 µg/mL (figura 9), dentre os 131 extratos analisados, 86 (65,6%; quadrantes 1 + 2 + 4) demonstraram alguma atividade biológica nos ensaios. Destes, 57 (66,3% dentre os extratos ativos; quadrante 4) foram ativos exclusivamente como anticâncer na concentração de 50 µg/mL, de um total de 81 (94,2% dentre os extratos ativos; quadrantes 1 + 4) extratos com atividade anticâncer nesta concentração. No quadrante 2, vê-se as 5 cepas (5,8% dentre os extratos ativos) cujos extratos apresentaram apenas ação antimalárica na concentração de 5 µg/mL. No quadrante 1, 24 (27,9% dentre os extratos ativos) extratos exibiram ação antitumoral e antimalárica.



**Figura 9.** Dados de atividade biológica dos extratos obtidos de cada cepa de bactéria analisada, sendo o valor percentual aferido para a atividade antimalárica a 5 µg/mL no eixo X e o valor para atividade anticâncer a 50 µg/mL no eixo Y. O quadrante 1 (superior à direita) agrupa os extratos ativos nas duas atividades biológicas; no quadrante 2 (inferior à direita) estão os extratos ativos apenas como antimaláricos; no quadrante 3 (inferior à esquerda) estão os extratos inativos nos dois ensaios; e no quadrante 4 (superior à esquerda) contam os extratos ativos apenas como anticâncer.

Uma análise mais detalhada da figura 9, amparada nos gráficos da figura 10, permite observar que a parametrização dos extratos anticâncer em concentração 10 vezes maior resultou na redução do percentual de extratos inativos quando comparado à análise 5x5, sendo o mesmo observado para os extratos antimaláricos (figura 10A). Reunindo-se os três grupos aqui categorizados quanto ao perfil da atividade biológica – antimalárico+anticâncer, apenas antimalárico e apenas anticâncer –, em números absolutos, a maioria das bactérias produtoras de extratos ativos foram recuperadas das amostras de sedimento de Ubatuba, entretanto isso não repete quando considerados em termos percentuais, como mostra a figura 10B. Para o perfil de atividade dos extratos categorizados como apenas antimalárico ou ativos em ambos os ensaios, não foram observadas diferenças notórias quanto ao método de pré-tratamento do sedimento que

resultou no isolamento das cepas produtoras dos extratos ativos, ao passo que a maioria dos extratos ativos foi produzido por cepas recuperadas do meio SWA. Ao contrário, os extratos exclusivamente anticâncer foram obtidos de cepas recuperadas de sedimento submetido ao método M2, sendo que os três meios demonstraram aproximadamente o mesmo rendimento. Esses dados estão apresentados nas figuras 10C, D e E.



**Figura 10.** Porcentagem dos extratos testados, separados de acordo com a atividade anticâncer, atividade antimalárica, atividade em ambos os ensaios e inatividade do gráfico 5x50µg/mL (A). Relação entre o total de extratos isolados e o total de extratos ativos para cada localidade de onde as cepas foram recuperadas (B). Distribuição das cepas que apresentaram atividade em ambos os ensaios no gráfico 5x50µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (C). Distribuição das cepas que apresentaram atividade antimalárica no gráfico 5x50µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (D). Distribuição das cepas que apresentaram atividade anticâncer no gráfico 5x50µg/mL quanto ao meio de cultura e método de isolamento (E).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou uma estratégia para triagem de extratos obtidos de cepas de bactérias marinhas visando a seleção daqueles mais interessantes para estudos de atividade biológica. Este trabalho centrou-se na caracterização das cepas e no perfil de atividade biológica quanto a avaliação do potencial anticâncer e antimalárico apresentado por extratos obtidos de 131 cepas depositadas no banco de cepas do grupo de pesquisas que está armazenado junto ao Laboratório de Farmacologia Marinha, na Universidade de São Paulo.

Grande parte dos extratos aqui comparados por sua atividade biológica foram obtidos de cepas bacterianas recuperadas de sedimento do marinho coletado no litoral do estado de São Paulo. Rigato (2018), em sua dissertação de mestrado desenvolvida junto ao nosso grupo de pesquisa, recuperou 231 cepas advindas do sedimento das regiões da Baixada Santista, Ilhabela e São Sebastião. Em seu estudo, o autor descreve que os extratos obtidos de 81 destas cepas apresentaram atividade anticâncer acima de 75% na concentração de 50 µg/mL e, dentre elas, 25 apresentaram ação inibitória acima de 75% nas duas concentrações testadas (5 µg/mL e 50 µg/mL). O percentual utilizado foi estabelecido pelo grupo de pesquisa para manter uma padronização dos parâmetros de avaliação para o banco de cepas. Extratos obtidos de 44 cepas analisados em Rigato (2018) foram também acessados aqui, sendo que 25 e 33 foram considerados ativos, respectivamente, na análise 5x5 e 5x50. Mais além, após a triagem para atividade anticâncer, Rigato (2018) destacou o extrato de duas cepas como interesse prioritário do seu estudo, sendo elas BRB-094 e BRB-104, com  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% da proliferação celular) calculadas para HCT-116 após 72h de exposição foi de 0,29 e 5,89 µg/mL, respectivamente. No presente estudo, constatou-se BRB-094 foi ativo em ambos os ensaios, sendo que BRB-104 mostrou-se ativo apenas como anticâncer, não apresentando atividade antimalárica.

Souza (2020), integrante do nosso grupo de pesquisa, em sua dissertação de mestrado trabalhou com sedimentos de 9 pontos de Ubatuba e 1 de Caraguatatuba. Foram isoladas 92 cepas, porém 80 cepas foram testadas por seu potencial biotecnológico, pois 12 destas cepas não puderam ser confirmadas por sua pureza. Das 80 bactérias, 25% demonstraram atividade citotóxica contra células tumorais HCT-116 acima de 75% na concentração de 50 µg/mL, sendo que 4 exibiram inibição maior que 75% na menor concentração (5 µg/mL). No presente estudo, 64 extratos analisados pela autora foram acessados, sendo que 20 e 35 foram considerados ativos nas análises 5x5 e 5x50, respectivamente. Mais além, após a seleção para atividade anticâncer, Souza (2020) destacou duas cepas interessantes, que foram ativas na menor concentração (5 µg/mL), para seu estudo, sendo elas BRB-592 e BRB-607, com  $CI_{50}$  calculadas para HCT-116 após 72h de exposição foi de 0,84 e 0,004 µg/mL. A avaliação realizada no presente trabalho mostrou que ambas as cepas foram ativas nos dois ensaios, sendo que o extrato de BRB-607 inibiu quase que completamente tanto o crescimento das células tumorais como o do parasita na concentração de 5 µg/mL (figura 7).

Cepas isoladas nos Trabalhos de Conclusão de Curso do Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar da UNIFESP de Alessandra Caldeirão de Moura e Mayara Ornelas dos Santos também foram incluídas no presente estudo. Moura (2018) recuperou 29 cepas do sedimento de três ilhas costeiras do estado de São Paulo. Santos (2018), por sua vez, isolou 62 bactérias de 9 locais de coleta do município de Ubatuba.

Os métodos de pré-tratamento empregado às amostras de sedimento antes de serem semeados no meio semi-sólido, M1 (dessecação e carimbo) e M2 (aquecimento e esgotamento por estrias), têm a finalidade de submeter bactérias do sedimento marinho através a estresse físico-químico, o que favorece o aparecimento das bactérias mais resistentes ao calor e à desidratação, como as actinobactérias, que são a classe de micro-organismos que o grupo de pesquisa prioriza para o isolamento, em princípio, por serem uma classe de micro-organismos profícua em produzir moléculas com atividade biológica (Bérdy, 2005). Das 131 cepas analisadas neste estudo, 61,1% foram obtidas pelo tratamento M2 e 38,9% pelo tratamento M1. Ao focarmos nos extratos ativos do gráfico de dispersão 5x5 µg/mL (figura 7), os percentuais de isolamento para M1 e M2 foram 41,8% e 58,2%, respectivamente. Para o gráfico de dispersão 5x50 µg/mL (figura 9), 37,2% são advindos do método M1 enquanto 62,8% são do método M2. Já era esperado que a maioria das cepas fossem obtidas pelo tratamento M2, visto que nos trabalhos citados anteriormente, esse método foi mais eficiente na recuperação de bactérias. O estudo realizado por Jensen e colaboradores, 2005, utilizou 227 amostras de sedimentos coletados ao redor da Ilha de Guam, no Oceano Pacífico, em que a maioria das amostras foram processadas pelos métodos M1 e M2, recuperando 44% e 47%, respectivamente, de cepas isoladas. Diferentemente do que pode ser visto no trabalho de Guimarães (2013), o tratamento de dessecação e carimbo (M1) recuperou 69% das 26 cepas isoladas do sedimento da Praia da Pedra Rachada, Ceará, enquanto o método M2 recuperou 31%. Isso foi também relatado por Ferreira e colaboradores (2016), e com porcentagens similares a de Guimarães (2013). O método M1 foi responsável por isolar 64,5% das 268 cepas recuperadas do sedimento do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, ao passo que M2 isolou 35,5%.

Em relação aos meios de cultivo, foram utilizados: meio A1, rico em nutrientes; TM (*Trace Mineral Agar*), meio pobre em nutrientes e enriquecido com metais traço; e SWA (*Sea Water Agar*), meio pobre em nutrientes. De todas as 131 bactérias neste estudo, o

meio SWA foi mais efetivo na recuperação de cepas (39,7%), seguido pelo meio TM (37,4%) e meio A1 (22,9%). Focando nos 55 extratos ativos do gráfico de dispersão 5x5 µg/mL (figura 7), 41,8% foram isolados a partir do meio SWA enquanto 29,1% foram recuperados em cada um dos meios TM e A1. Para o gráfico de dispersão 5x50 µg/mL (figura 9), com 86 extratos ativos, os percentuais de isolamento para A1, TM e SWA foram, respectivamente, 29,1%, 31,4% e 39,5%. O meio SWA por ser menos nutritivo e por ter isolado mais cepas, favoreceu o crescimento de bactérias mais resistentes a mudanças ambientais. Estudos realizados anteriormente por Guimarães (2013) e Ferreira *et al.* (2016), tiveram uma melhor porcentagem de isolamento através do meio TM, com 31% e 33,6%, respectivamente. Entretanto, a diferença das porcentagens com o meio mais pobre, não passam de 5% (27% e 31,7%, na mesma ordem). Em geral, meios mais pobres nutricionalmente recuperaram melhor as cepas de actinobactérias, como visto por Jensen e colaboradores (2005).

Na avaliação inicial qualitativa da citotoxicidade dos extratos obtidos das bactérias armazenadas no banco de cepas, é tipicamente utilizada, pelo nosso grupo de pesquisa, a linhagem de carcinoma color-retal humano HCT-116. Para tal, é realizado o ensaio colorimétrico do MTT, que afere indiretamente a quantidade de células viáveis a partir de sua atividade metabólica (Mosmann, 1983). Os extratos considerados ativos seguem para um *screening* de atividade biológica de âmbito quantitativo contra um painel de linhagens celulares (tumoriais, na maioria, e também não-tumoriais) de diversas origens histológicas visando a determinação do valor da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para cada linhagem celular. Os testes realizados contra este painel de células *in vitro* auxiliam na identificação de extratos mais promissores buscando uma atividade seletiva dos extratos tanto às células tumorais como, mais ainda, a células obtidas de tumores de mesma origem histológica, visto que estas características podem sugerir mecanismos ou alvos menos genéricos. Mais além, recentemente, nosso banco de cepas vem tendo os extratos das bactérias acessados por outras atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida, além da atividade antimalárica aqui apresentada. Entretanto, este é o primeiro estudo que acessa de forma combinada e comparativa as atividades anticâncer e antimalárica dos extratos obtidos das bactérias marinhas ali depositadas.

Vale ressaltar, ainda, que estudos voltados a avaliar extratos de bactérias marinhas por seu potencial anticâncer combinado ao antimalárico são escassos na literatura, sendo encontrados, em sua maioria, trabalhos avaliando o potencial de um

mesmo grupo de extratos naturais de bactérias marinhas em um ou outro ensaio, ou seja, ou por sua atividade anticâncer, ou por seu potencial antimalárico. Entretanto, Prudhomme e colaboradores (2008) demonstraram que a substância salinosporamida A (Marizomib®), obtida de *Salinispora tropica*, já conhecida por seu potencial anticâncer, possui uma alta atividade inibitória contra os estágios eritrocíticos do ciclo do parasita da malária, *in vitro*, com uma IC<sub>50</sub> de 11,4 nM.

No presente estudo, os dados de atividade biológica foram plotados em formato de dispersão de pontos buscando proporcionar uma visualização combinada da atividade biológica dos extratos que abrangesse ambos os ensaios aos quais foram submetidos, como apresentados nas figuras 7 e 9. Neste formato, os extratos designados aos quadrantes 2 e 4, ou seja, aqueles ativos em apenas um dos ensaios, são tidos pelo grupo como os de maior interesse para a prospecção de informações visto que, possivelmente, possuem mecanismos de ação mais específicos e seletivos, pois foram capazes de distinguir entre os modelos. Neste contexto, estes extratos serão priorizados em futuros estudos envolvendo a identificação taxonômica da cepa produtora e a investigação das características químicas dos extratos, bem como outras atividades biológicas.

A partir destas ponderações, alguns extratos podem ser destacados por seu perfil de atividade biológica. A partir da dispersão de pontos 5x50 (figura 9), pode-se observar entre os quadrantes 1 e 4, 81 extratos com atividade anticâncer, sendo que apenas 26 destes extratos estão incluídos no quadrante 4 da análise 5x5 (figura 7), que agrupa os extratos exclusivamente anticâncer a 5 µg/mL, uma concentração 10 vezes menor. Mais além, à mesma concentração, os extratos demonstraram reduzida atividade antimalárica, com ênfase aos extratos das cepas BRB-002, BRB-004 e BRB-096, que se mostraram citotóxicas para quase a totalidade das células tumorais HCT-116 ao mesmo tempo que interferiram minimamente na proliferação do parasita *P. falciparum*. Mais além, o extrato da cepa BRB-216 também merece ser destacado ao não demonstrar toxicidade ao parasita e inibir aproximadamente 80% do crescimento das células tumorais a 5 µg/mL. A inibição de 100% da proliferação das células HCT-116 a 50 µg/mL sugere um perfil mais citostático, ainda que potente, de atividade anticâncer deste extrato, visto que uma concentração 10 vezes menor acarreta numa redução suave da inibição do crescimento.



Também é interessante destacar do gráfico de dispersão 5x50 (figura 9) os 5 extratos localizados no quadrante 2 (ação antimalárica), que não demonstraram atividade citotóxica contra células tumorais humanas nem em doses 10 vezes mais alta do que a utilizada no ensaio antimalárico. Os extratos são das cepas BRB-237, BRB-241, BRB-244, BRB-589 e BRB-600, que inibiram entre 62% a 90% a proliferação do parasita *P. falciparum*, sendo a BRB-241 a mais ativa. Esta mesma cepa demonstrou inibição inferior a 16% na proliferação das células HCT-116 na concentração de 50 µg/mL, e na concentração de 5 µg/mL, sua atividade foi de 0%. A cepa BRB-589 foi a segunda mais ativa com 85,22% de ação antimalárica. Em relação a sua atividade anticâncer, na concentração de 50 µg/mL teve uma ação de 19,89% e, para 5 µg/mL, sua atividade também foi de 0%.

Extratos obtidos de organismos vivos, ou seja, compostos por produtos naturais, são complexos quando consideradas a sua composição química e atividade biológica. Estudos sequenciais visando à exploração do potencial farmacológico seriam, tradicionalmente, voltados à otimização do processo para obtenção dos extratos em maiores quantidades, fracionamento químico, visando à separação e, maiormente, o isolamento dos componentes de interesse destes extratos, e identificação, caracterização e elucidação estrutural dos seus princípios ativos (Jensen & Fenical, 2000). Quanto aos estudos sequenciais de atividade biológica, além de obter-se os princípios ativos em quantidades suficientes para a condução destes ensaios, as substâncias de interesse seriam aferidas por sua eficácia em modelos *in vitro* e *in vivo* da patologia em questão (Wagner-Döbler et al., 2002), sendo que a seletividade é um parâmetro crucial a ser ponderado na assimilação de novas quimioterapias por diretamente refletir em toxicidade e efeitos adversos. Todos esses passos são custosos considerando o tempo e o aporte financeiro para que sejam executados com precisão e acurácia. E, ainda que não se possa completamente excluir alguns fatores erráticos, os extratos naturais que seguem nestes estudos devem ser criteriosamente escolhidos.

Aqui, a estratégia de triagem de extratos naturais empregada para identificar aqueles mais interessantes para prosseguimento dos estudos, para além da comparação de seus efeitos em um ou outro modelo de atividade biológica, focou-se na visualização combinada destes efeitos. Este formato didático permitiu a categorização individual destes extratos em referência às atividades avaliadas, ressaltando que, se aferidos em igual concentração, entre as amostras acessadas neste estudo, os extratos com efeito

exclusivamente anticâncer correspondem a aproximadamente o somatório das outras duas condições, ou seja, aqueles ativos em ambos os ensaios e aqueles exclusivamente antimaláricos (figura 8A). Mais além, se aferidos por sua atividade anticâncer em concentração 10 vezes superior à antimalárica, observou-se que o número de extratos exclusivamente anticâncer dobra em relação à aferição anterior (figura 10A), sendo que o efeito exclusivamente antimalárico fica restrito a apenas 5 extratos, mostrando-se o evento mais raro nesta amostra sob estes parâmetros. Dessa forma, dentro das categorias, esta estratégia também possibilitou encontrar extratos com especificidades, em termos de potência, pelo menos, que se adequassem aos critérios desejados, ressaltando extratos específicos como mais promissores.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo identificar extratos obtidos de bactérias marinhas depositadas no banco de cepas do Laboratório de Farmacologia Marinha com melhor potencial para o desenvolvimento de estudos sequenciais de atividade biológica. A partir da estratégia de visualização combinada dos dados para atividade anticâncer e atividade antimalárica dos 131 extratos, além dos critérios de seleção admitidos aqui, foi observado que cerca de 20% dos extratos mostraram-se mais interessantes para estudo de sua atividade anticâncer, com destaque aos extratos obtidos de 3 cepas, a saber, BRB-002, BRB-004 e BRB-096. Quanto à atividade antimalárica, foi identificado que quase 4% dos extratos apresentaram parâmetros aqui pretendidos, com ênfase aos obtidos das cepas BRB-241 e BRB-589.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P.A.; SOUZA, T.D.S.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; ROCHA, D.D.; FREITAS, H.P.S.; PESSOA, O.D.L.; LA CLAIR, J.J.; COSTA-LOTUFO, L.V. Identification of Pyrroloformamide as a Cytokinesis Modulator. *Chem Bio Chem*, v. 15, n. 4, p. 501-506, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.201300717>
- AL-DHABI, N.A.; ESMAIL, G.A.; GHILAN, A.K.M.; ARASU, M.V.; DURAI PANDIYAN, V.; PONMURUGAN, K. Chemical constituents of *Streptomyces* sp. strain Al-Dhabi-97 isolated from the marine region Saudi Arabia with antibacterial and anticancer properties. *Journal of Infection and Public Health*, v. 13, p. 235-243, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.09.004>
- ARTHAUD, I.D.B.; RODRIGUES, F.A.R.; JIMENEZ, P.C.; MONTENEGRO, R.C.; ANGELIM, A.L.; MACIEL, V.M.M.; SILVEIRA, E.R.; FREITAS, H.P.S.; SOUSA, T.S.;

PESSOA, O.D.L.; LOTUFO, T.M.C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. Isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. *Chemistry & Biodiversity*, v. 9, n. 2, p. 418-427, fev. 2012. DOI: 10.1002/cbdv.201100092

AZEVEDO, M.F.; NIE, C.Q.; ELSWORTH, B.; CHARNAUD, S.C.; SANDERS, P.R.; CRABB, B.S. GILSON, P.R. Plasmodium falciparum transfected with ultra-bright NanoLuc luciferase offers high sensitivity detection for the screening of growth and cellular trafficking inhibitors. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, p. e112571, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112571>

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, abr. 2009.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of antibiotics* (Tokyo), v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005. DOI: 10.1038/ja.2005.1

BERLINK, R.G.S.; BORGES, W.S.; SCOTTI, M.T.; VIEIRA, P.C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. *Química Nova*, v. 40, n. 6, p. 706-710, mai. 2017. DOI: [dx.doi.org/10.21577/01000-4042.20170070](https://doi.org/10.21577/01000-4042.20170070)

BERLINK, R.G.S.; HAJDU, E.; DA ROCHA, R.M.; DE OLIVEIRA, J.H.H.L.; HERNÁNDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; DE ALMEIDA, É.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *J. Nat. Prod.*, v. 67, p. 510-522, jan. 2004. DOI: 10.1021/np0304316

CHE, P.; CUI, L.; KUTSCH, O.; LI, Q. Validating a firefly luciferase-based high-throughput screening assay for antimalarial drug discovery. *Assay and drug development technologies*, v. 10, n. 1, p. 61-68, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0378>

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFANIO, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 703-716, abr. 2009.

ENGLAND, C.G.; EHLRTDING, E.B; CAI, W. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjugate Chem.*, v. 27, n. 5, p. 1175-1187, 2016. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112

FATTORUSO, E. & TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Marine antimalarials. *Mar. Drugs*, v. 7, n. 2, p. 130-152, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/md7020130>

FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Natural Chemical Biology*, v. 12, n. 12, p. 666-673, dec. 2006. DOI: 10.1038/nchembio841

FERREIRA, E.; TORRES, M.C.M.; SILVA, A.B.; COLARES, L.L.F.; PIRES, K.; LOTUFO, T.M.C.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; COSTA-LOTUFO, L.V.; JIMENEZ, P.C. Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. *Chemistry & biodiversity*, v. 13, n. 9, p. 1149-1157, 2016. DOI: 10.1002/cbdv.201500514

GADEMANN, K. & KOBYLINSKA, J. Antimalarial natural products of marine and freshwater origin. *The Chemical Record*, v. 9, n. 3, p. 187-198, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/tcr.200900001>

GUIMARÃES, L. A. Potencial anticâncer de actinomicetos recuperados do sedimento da praia da Pedra Rachada, Paracuru, Ceará. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2013.

GUIMARÃES, L.A.; JIMENEZ, P.C.; SOUSA, T.D.S.; FREITAS, H.P.S.; ROCHA, D.D.; WILKE, D.V.; MARTÍN, J.; REYES, F.; PESSOA, O.D.L.; COSTA-LOTUFO, L.V. Chromomycin A2 induces autophagy in melanoma cells. *Mar. Drugs*, v. 12, n. 12, p. 5839-5855, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/md12125839>

ÍOCA, L.P.; ALLARD, P.M.; BERLINCK, R.G.S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. *Nat. Prod. Rep.*, v. 31, n. 5, p. 646-675, abr. 2014. DOI: 10.1039/c3np70112c

JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. In: Nobushiro, F., ed. *Drugs from the sea*. Karger, Tokyo, p. 6-29, 2000.

JENSEN, P.R.; GONTANG, E.; MAFNAS, C.; MINCER, T.J.; FENICAL, W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 1039-1048, 2005. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x

JIMENEZ, P.C.; FERREIRA, E.G.; ARAÚJO, L.A.; GUIMARÃES, L.A.; SOUSA, T.S.; PESSOA, O.D.L.; LOTUFO, T.M.C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxicity of actinomycetes associated with the ascidian *Eudistoma vannamei* (Millar, 1977), endemic of northeastern coast of Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 41, n. 2, p. 335-343, 2013. DOI: 10.3856/vol41-issue2-fulltext-12

JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; BRANCO, P.B.; BAUERMEISTER, A.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; GAUDÊNCIO, S.P.; COSTA-LOTUFO, L.V. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *British Journal of Pharmacology*, v. 177, n. 1, p. 3-27, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.14876>

JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; COSTA-LOTUFO, L.V. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics*, v. 73, n.1, e482s, dez. 2018. DOI: 10.6061/clinics/2018/e482s

LAPORT, M.S.; BAUWENS, M.; DE OLIVEIRA NUNES, S.; WILLENZ, P.; GEORGE, I.; MURICY, G. Culturable bacterial communities associated to Brazilian *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha) and their antagonistic interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 110, n. 4, p. 489-499, abr. 2017. DOI: 10.1007/s10482-016-0818-y

MATSUO, Y.; KANO, K.; YAMORI, T.; KASAI, H.; KATSUTA, A.; ADACHI, K.; SHIN-YA, K.; SHIZURI, Y. Urukthapelstatin A, a novel cytotoxic substance from marine-derived *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542: I. Fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, v. 60, n.4, p. 251-255, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2007.30>

MCCARTHY, P.J.; ROBERTS, B.F.; CARBONELL, A.; ROBERTS, J.; WRIGHT, A.E.; CHAKRABARTI, D. Microbiome as a source of antimalarials. *Trop. Med. Infect. Dis.*, v. 4, n. 3, p. 103, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4030103>

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P. Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, v. 8, p. 69-85, jan. 2009. DOI:10.1038/nrd2487

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Med. Chem.*, v. 3, n. 12, p. 1475-1489, 2011. DOI: 10.4155/fmc.11.118

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4 PMID: 6606682.

MOURA, A. C. Bioprospecção farmacológica de bactérias recuperadas de sedimento marinho de ilhas costeiras do estado de São Paulo. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar - Departamento de Ciências do Mar - Universidade Federal de São Paulo, 2018.

NA-BANGCHANG, K. & KARBWANG, J. Pharmacology of antimalarial drugs, current anti-malarials. *Encyclopedia of Malaria*, Springer, New York, NY. 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8757-9\_149-1

NEWMAN, D.J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 28, n. 3, mar. 2017. DOI: dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160225

PRUDHOMME, J.; MCDANIEL, E.; PONTS, N.; BERTANI, S.; FENICAL, W.; JENSEN, P.; LE ROCH, R. Marine actinomycetes: A new source of compounds against the human malaria parasite. *PloSone*, v. 3, n. 6, p. e2335, 2008. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002335

RIGATO, D. B. Bioprospecção de Microorganismos Recuperados do Sedimento do Litoral de São Paulo com Potencial Anticâncer. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Curso de Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos - Departamento de Ciência do Mar - Universidade Federal de São Paulo, 2018.

SAHM, B.D.B.; PERES, J.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; SANTOS, E.A.; BRANCO, P.C.; BAUERMEISTER, A.; KIMANI, S.; MOREIRA, E.A.; BISI-ALVES, R.; BELLIS, C.; MLAZA, M.; JIMENEZ, P.C.; LOPES, N.P.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; PRINCE, S.; COSTA-LOTUFO, L.V. Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. *Front. Chem.*, v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fchem.2020.00110

SANTOS, M. O. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias recuperadas de sedimento marinho coletado em Ubatuba, no litoral norte do estado de São Paulo. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia do Mar - Departamento de Ciências do Mar - Universidade Federal de São Paulo, 2018.

SOUSA, T.D.S.; JIMENEZ, P.C.; FERREIRA, E.G.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; COSTA-LOTUFO, L.V. Anthracyclines from *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, v. 75, n. 3, p. 489-493, 2012. DOI: https://doi.org/10.1021/np200795p

SOUZA, B. V. Bioprospecção de Actinomicetos com Potencial Anticâncer em Sedimentos Marinhos de Praias e Ilhas da Estância Balneária de Ubatuba, SP. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Curso de Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos - Departamento de Ciência do Mar - Universidade Federal de São Paulo, 2020.

TAJUDDEEN, N. & VAN HEERDEN, F.R. Antiplasmodial natural products: an update. *Malarial Journal*, v. 18, n. 1, p. 404, 2019. DOI: https://doi.org/10.1186/s12936-019-3026-1

THOMPSON, F.; KRÜGER, R.; THOMPSON, C.C.; BERLINCK, R.G.S.; COUTINHO, R.; LANDELL, M.F.; PAVÃO, M.; MOURÃO, P.A.S.; SALLES, A.; NEGRI, N.; LOPES, F.A.C.; FREIRE, V.; MACEDO, A.J.; MARASCHIN, M.; PÉREZ, C.D.; PEREIRA, R.C.; RADIS-BAPTISTA, G.; REZENDE, R.P.; VALENTI, W.C.; ABREU, P.C.; BioTecMar Network. Marine biotechnology in Brazil: Recent developments and its potential for innovation. *Front. Mar. Sci*, v. 5:236, jul. 2018. DOI: 10.3389/fmars.2018.00236

UM, S.H.; CHOI, T.J.; KIM, H.G.; KIM, B.Y.; KIM, S.H.; LEE, S.K.; OH, K.B.; SHIN, J.H.; OH, D.C. Ohmyungsamycins A and B: Cytotoxic and Antimicrobial Cyclic Peptides Produced by *Streptomyces* sp. from a Volcanic Island. *J. Org. Chem.*, v. 78, n. 24, p. 12321-12329, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/jo401974g>

WAGNER-DÖBLER, I.; BEIL, W.; LANG, S.; MEINERS, M.; LAATSCH, H. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, p. 207-238, 2002.

WANG, E.; SOROLLA, M.A.; KRISHNAN, P.D.G.; SOROLLA, A. From seabed to bedside: a review on promising marine anticancer compounds. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 248, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10020248>

WATERS, A.L.; PERAUD, O.; KASANA, N.; SIMS, J.W.; KOTHAWALA, N.; ANDERSON, M.A.; ABBAS, S.H.; RAO, K.V.; JUPALLY, V.R.; KELLY, M.; DASS, A.; HILL, R.T.; HAMANN, M.T. An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora* sp. microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Front. Mar. Sci.*, v. 1, n. 54, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00054>

WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; BRANCO, P.C.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; TRINDADE-SILVA, A.E.; BAUERMEISTER, A.; LOPES, N.; COSTA-LOTUFO, L.V. Anticancer Potencial Of Compounds from The Brazilian Blue Amazon. *Planta Medica*, 2020. DOI: 10.1055/a-1257-8402

ZHANG, L.; AN, R.; WANG, J.; SUN, N.; ZHANG, S.; HU, J.; KUAI, J. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 276-281, jun. 2005. DOI: 10.1016/j.mib.2005.04.008

ZOTCHEV, S.B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of Biotechnology*, v. 158, n. 4, p. 168-175, abr. 2012. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.002